

09/913521

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

PCT/JP 00/00778

10.03.00

REC'D 28 APR 2000

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

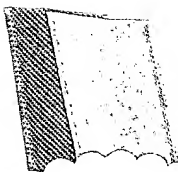
1999年 2月15日

出願番号
Application Number:

平成11年特許願第035963号

出願人
Applicant(s):

日本新薬株式会社



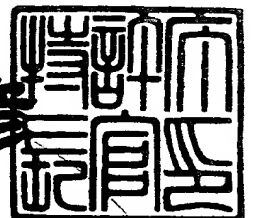
PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 4月14日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特2000-3025738

【書類名】 特許願

【整理番号】 P-416N-LIC

【提出日】 平成11年 2月15日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C07H 21/02

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府京都市南区吉祥院西ノ庄門口町 1 4 番地 日本新薬株式会社内

 【氏名】 松山 伸二

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市桜三丁目 1 4 - 1 日本新薬株式会社 東部創薬研究所内

 【氏名】 石山 幸一

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府京都市南区吉祥院西ノ庄門口町 1 4 番地 日本新薬株式会社内

 【氏名】 関 純造

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市桜三丁目 1 4 - 1 日本新薬株式会社 東部創薬研究所内

 【氏名】 大木 忠明

【特許出願人】

 【識別番号】 000004156

 【氏名又は名称】 日本新薬株式会社

 【代表者】 市野瀬 浩

 【電話番号】 075-321-9086

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 005234

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 短鎖化ポリヌクレオチド及びその製法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】短鎖化されたポリヌクレオチド又はその塩において、2'-5' リン酸ジエステル結合が全リン酸ジエステル結合の 3 % 以下であることを特徴とする短鎖化ポリヌクレオチド又はその塩。

【請求項 2】ポリヌクレオチドが、ポリイノシン酸若しくはそのアナログ、ポリシチジル酸若しくはそのアナログ、ポリアデニル酸若しくはそのアナログ、又はポリウリジル酸若しくはそのアナログである、請求項 1 記載の短鎖化ポリヌクレオチド又はその塩。

【請求項 3】平均鎖長が 0.1k bases ~ 1 k bases の範囲内にある、請求項 1 又は 2 記載の短鎖化ポリヌクレオチド又はその塩。

【請求項 4】請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の短鎖化ポリヌクレオチド又はその塩において、二本鎖を形成しうる 2 つの短鎖化ポリヌクレオチド又はその塩から形成される二本鎖短鎖化ポリヌクレオチド又はその塩。

【請求項 5】二本鎖を形成しうる 2 つの短鎖化ポリヌクレオチドが、ポリイノシン酸とポリシチジル酸、ポリアデニル酸とポリウリジル酸、ポリイノシン酸アナログとポリシチジル酸、ポリイノシン酸とポリシチジル酸アナログ、ポリイノシン酸アナログとポリシチジル酸アナログ、ポリアデニル酸アナログとポリウリジル酸、ポリアデニル酸とポリウリジル酸アナログ及びポリアデニル酸アナログとポリウリジル酸アナログからなる群から選択される、請求項 4 記載の二本鎖短鎖化ポリヌクレオチド又はその塩。

【請求項 6】ポリヌクレオチド又はその塩を、pH 7 ~ 10、20 ~ 110℃ の反応条件で短鎖化することを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の短鎖化ポリヌクレオチド又はその塩の製法。

【請求項 7】薬物を細胞内へ移入するのに有効な担体と、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の短鎖化ポリヌクレオチド若しくはその塩、又は請求項 4 ~ 5 のいずれかに記載の二本鎖短鎖化ポリヌクレオチド若しくはその塩とを必須構成成分として形成される複合体を含有する組成物。

【請求項 8】薬物を細胞内へ移入するのに有効な担体が、正電荷を有する担体である、請求項 7 記載の組成物。

【請求項 9】正電荷を有する担体が、カチオニック・リボソームである、請求項 8 記載の組成物。

【請求項 10】薬物を細胞内へ移入するのに有効な担体が、2-0-(2-ジエチルアミノエチル)カルバモイル-1, 3-0-ジオレオイルグリセロール及びリン脂質を必須構成成分として形成される担体である、請求項 7 記載の組成物。

【請求項 11】組成物が薬剤である請求項 7～10 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 12】薬剤が、インターフェロン誘導化剤、免疫賦活剤、細胞内ヌクレアーゼ活性化剤、癌治療剤もしくは予防剤、又は肝炎治療剤もしくは予防剤である請求項 11 記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、特に医薬として有用な短鎖化ポリヌクレオチド、及びその製法に関するものである。詳細には、本発明は、短鎖化された合成ポリヌクレオチド又はその塩において、2'-5' リン酸ジエステル結合が全リン酸ジエステル結合の 3% 以下であることを特徴とする短鎖化ポリヌクレオチド又はその塩、及びそれらの製法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

ポリイノシン酸・ポリシチジル酸に代表されるポリヌクレオチドは、当業者において周知の化合物であり、インターフェロン誘導作用、免疫賦活作用等を有することから、肝炎治療剤や癌治療剤としての可能性が検討されてきた。

かかるポリヌクレオチドの薬理作用は、その鎖長と高い相関があり、鎖長が長くなればなるほどインターフェロン誘導作用等が強くなる。しかし、その反面、鎖長が長くなればなるほど毒性が強く現れる。

【0003】

最近、ポリヌクレオチドを加水分解によって短鎖化した比較的短い合成ポリヌクレオチドをカチオン性・リポソームのような、薬物を細胞内へ移入するのに有効な担体に封入するといった手法により、ポリヌクレオチドの有用な薬理作用を保持しつつ、毒性を軽減する試みがなされている（例えば、PCT/JP98/04695号、特願平10-76055号）。

ところで、上記のようにポリヌクレオチドを加水分解によって短鎖化すると、短鎖化と同時にシュードローテーションという機構を介して、一部のリン酸基が3'位から2'位へ分子内転位することが知られている（例えば、「蛋白質 核酸 酵素」Vol.40, No.10, pp.1323-1332 (1995)参照）。その結果、短鎖化ポリヌクレオチド分子内の3'-5'リン酸ジエステル結合の一部が、2'-5'リン酸ジエステル結合に置き換わることになる。このようなリン酸の転位現象が薬理作用にどのような影響を及ぼすのかは知られていない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、第一に、医薬としてより有効でより安全な短鎖化ポリヌクレオチド及びその塩、並びにその二本鎖短鎖化ポリヌクレオチド及びその塩を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、主に短鎖化反応の際に生ずる2'-5'リン酸ジエステル結合を一定割合以下しか有しない短鎖化ポリヌクレオチド及びその塩が上記課題を解決しうることを見出し、本発明を完成した。

【0006】

本発明の一つは、従って、短鎖化されたポリヌクレオチド又はその塩において、2'-5'リン酸ジエステル結合が全リン酸ジエステル結合の3%以下、好ましくは2%以下であることを特徴とする短鎖化ポリヌクレオチド又はその塩である。

【0007】

また、上記2'-5'リン酸ジエステル結合が全リン酸ジエステル結合の3%以下

、好ましくは2%以下の短鎖化ポリヌクレオチド又はその塩において、二本鎖を形成しうる2つの短鎖化ポリヌクレオチド又はその塩から形成される二本鎖短鎖化ポリヌクレオチド又はその塩も本発明として挙げるができる。さらには、薬物を細胞内へ移入するのに有効な担体と、上記2'-5' リン酸ジエステル結合が全リン酸ジエステル結合の3%以下の短鎖化ポリヌクレオチド若しくはその塩、又はその二本鎖を形成しうる2つの短鎖化ポリヌクレオチド若しくはその塩から形成される二本鎖短鎖化ポリヌクレオチド若しくはその塩とを必須構成成分として形成される複合体を含有する組成物も本発明として挙げるができる。

【0008】

本発明に係るポリヌクレオチドは、各々のヌクレオチドがリン酸ジエステル結合を介して直鎖状に重合した化合物で、重合するヌクレオチドの数がおよそ20個以上のものをいい、合成又は天然のものを挙げるができる。具体例としては、ポリイノシン酸若しくはそのアナログ、ポリシチジル酸若しくはそのアナログ、ポリアデニル酸若しくはそのアナログ、又はポリウリジル酸若しくはそのアナログを挙げることができる。

【0009】

ポリイノシン酸アナログは、イノシン酸の全部又は一部が化学修飾されたホモポリマーか、イノシン酸と他の核酸塩基とのコポリマーであり、例えば、ポリ(7-デアザイノシン酸)、ポリ(2'-アジドイノシン酸)を挙げることができる。ポリシチジル酸アナログは、シチジル酸の全部又は一部が化学修飾されたホモポリマーか、シチジル酸と他の核酸塩基とのコポリマーであり、例えば、ポリ(5-ブロモシチジル酸)、ポリ(2-チオシチジル酸)、ポリ(シチジン-5'-チオリン酸)、ポリ(シチジル酸、ウリジン酸)、ポリ(シチジル酸、4-チオウリジン酸)、ポリ(1-ビニルシチジル酸)を挙げるができる。ポリアデニル酸アナログ、ポリウリジル酸アナログも同様である。これらの中、ポリイノシン酸、ポリシチジル酸が本発明において適当である。

【0010】

本発明に係る短鎖化ポリヌクレオチドの平均鎖長としては、0.1k bases~1k bases (base: 塩基数、1k basesは1000塩基数、以下「base(s)」を単に「b」

という)が適当であり、好ましくは200 b ~ 800 b であり、更に好ましくは300 b ~ 600 b である。当該平均鎖長は、例えば、後述する試験例5のような、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー法 (gel permeation chromatography、以下「GPC法」という)により容易に決定することができる。

【0011】

本発明に係る短鎖化ポリヌクレオチドは、n個のヌクレオチドから成るポリヌクレオチド分子内の(n-1)個のリン酸ジエステル結合のうち、2'-5' リン酸ジエステル結合数が全リン酸ジエステル結合数の3%以下であるが、好ましくは2%以下又は0.1%~2%、さらに好ましくは1%以下又は0.1%~1%である。

2'-5' リン酸ジエステル結合数率は、次式により求めることができる。

【0012】

【数1】

2'-5' リン酸ジエステル結合数率 (%) =

$$\frac{\text{ポリヌクレオチド分子内の 2'-5' リン酸ジエステル結合数}}{\text{ポリヌクレオチド分子内の全リン酸ジエステル結合数}} \times 100$$

【0013】

ポリヌクレオチドの3'位から2'位へのリン酸基の転位は、例えば後述する試験例6のような方法により、容易に確認することができる。即ち、3'-5' リン酸ジエステル結合を特異的に加水分解するヌクレアーゼP1酵素によりポリヌクレオチドをヌクレオシド、ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドレベルまで分解した後、末端のリン酸基を特異的に加水分解するアルカリホスファターゼ酵素で処理することにより全ヌクレオチドをヌクレオシドに変換する。一方、ヌクレアーゼP1酵素により分解されない2'-5' リン酸ジエステル結合を有するオリゴヌクレオチドは、アルカリホスファターゼ酵素で処理しても、分子内の2'-5' リン酸ジエステル結合が加水分解されないでヌクレオシドにまで分解されない。液体クロマトグラフィー等を用いて、ヌクレオシドとオリゴヌクレオチド(大部分は二量体

)を定量することにより、リン酸転位率を求めることができる。

【0014】

本発明における二本鎖を形成しうる2つの短鎖化ポリヌクレオチドとしては、例えば、ポリイノシン酸とポリシチジル酸、ポリアデニル酸とポリウリジル酸、ポリイノシン酸アナログとポリシチジル酸、ポリイノシン酸とポリシチジル酸アナログ、ポリイノシン酸アナログとポリシチジル酸アナログ、ポリアデニル酸アナログとポリウリジル酸、ポリアデニル酸とポリウリジル酸アナログ、ポリアデニル酸アナログとポリウリジル酸アナログを挙げることができる。従って、二本鎖を形成しうる2つの短鎖化ポリヌクレオチドから形成される二本鎖短鎖化ポリヌクレオチドとしては、例えば、ポリイノシン酸・ポリシチジル酸、ポリアデニル酸・ポリウリジル酸、ポリイノシン酸アナログ・ポリシチジル酸、ポリイノシン酸・ポリシチジル酸アナログ、ポリイノシン酸アナログ・ポリシチジル酸アナログ、ポリアデニル酸アナログ・ポリウリジル酸、ポリアデニル酸・ポリウリジル酸アナログ、ポリアデニル酸アナログ・ポリウリジル酸アナログを挙げることができる。これらの中、ポリイノシン酸・ポリシチジル酸が本発明において適当な二本鎖短鎖化ポリヌクレオチドとして挙げることができる。

【0015】

上記二本鎖短鎖化ポリヌクレオチドの平均鎖長は、全短鎖化ポリヌクレオチドの平均鎖長と考えるのが適当であり、この平均鎖長を二本鎖短鎖化ポリヌクレオチドの見掛け上の平均鎖長として塩基対数で表現することができる。従って、上記二本鎖短鎖化ポリヌクレオチドの平均鎖長として、0.1k bp ~ 1k bp (bp: 塩基対数、1k bp は1000塩基対数)を挙げることができ、200 bp~800 bpが好ましく、300 bp~600 bpがより好ましい。

【0016】

本発明に係る短鎖化ポリヌクレオチドの塩、及び二本鎖短鎖化ポリヌクレオチドの塩としては、医薬上許容される塩なら特に制限はなく、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩を挙げることができる。

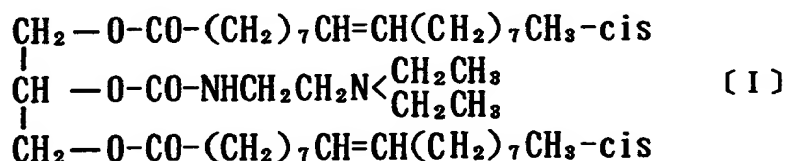
【0017】

薬物を細胞内へ移入するのに有効な担体としては、例えば、正電荷を有する担

体を挙げる事ができ、その具体例としては、ポリ-L- リジンのようなカチオン性ポリマーやリポフェクチン（登録商標）、リポフェクトアミン（登録商標）、リポフェクトエース（登録商標）、DMRIE-C（登録商標）等のカチオニック・リポソーム、またその一種と考えられ、PCT W094/19314号公報に開示されている、例えば、下記構造式〔I〕を有する2-0-(2- ジエチルアミノエチル)カルバモイル-1,3-0- ジオレオイルグリセロールとリン脂質（例えば、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、卵黄レシチン、大豆レシチン、これらの水素添加リン脂質）とを必須構成成分として形成される薬物担体を挙げる事ができる。

【0018】

【化1】



【0019】

上記カチオニック・リポソームは、正電荷を有し、負電荷を有するポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドと静電的な複合体を形成し、それが細胞膜と融合するとともに、ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドが細胞内に移入されることが考えられている。このような複合体は、リポブックスと呼ばれることがある。

【0020】

【発明の実施の形態】

本発明に係る短鎖化ポリヌクレオチドの製造方法について詳述する。本発明に係る短鎖化ポリヌクレオチドは、例えば、出発物質であるポリヌクレオチド溶液を、適当なpH範囲、適当な温度範囲で加熱加水分解することにより製造することができる。その際の水溶液のpHは、pH 7以上の塩基性が適当であり、pH 7～10が好ましい。また、短鎖化反応の速度及び塩基部分の安定性を考慮すれば、pH 8～

9 がより好ましい。一方、反応温度は、塩基の安定性から 20～110℃ の範囲内が適当であり、40～100℃ の範囲内が好ましい。しかし、十分な加水分解速度と塩基部分の安定性を考慮すれば、50～90℃ の範囲内がより好ましい。

【0021】

より具体的には、例えば、ポリヌクレオチドに水（注射用水、注射用蒸留水、生理食塩水など）を加え攪拌溶解し、緩衝剤や pH 調節剤を用いて pH 8～9 に調整する。そして反応温度 50～90℃ の範囲内において、平均鎖長とリン酸転位率をモニタリングしながら、0.5～60 時間、加熱加水分解することにより、リン酸転移の少ない 100 b～1000 b の平均鎖長を有する短鎖化ポリヌクレオチドを製造することができる。

【0022】

pH の調整には、医薬上許容される添加剤、例えば緩衝剤や pH 調節剤を使用しても良い。具体的にはアミノ酢酸（別名、グリシン）、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（別名、トリス）、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム（別名、重曹）、水酸化ナトリウム、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン等の緩衝剤や pH 調節剤を挙げることができる。これらの種類、組み合わせ及び濃度等は何ら限定されない。

反応液を透析処理や活性炭処理等すれば、モノマーや不要な塩、不純物、短鎖化により生成した反応副生成物などを系外に除去することができる。

【0023】

出発原料であるポリヌクレオチドは、天然、合成の起源、また塩の種類を問わない。天然のポリヌクレオチドとしては、例えば、tRNA やポリアデニル酸を挙げることができる。一方、合成ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドホスホリラーゼに代表される RNA 合成酵素やその固定化酵素から製造することができる。また、インターフェロン誘導試薬として市販されているポリイノシン酸ナトリウム塩やポリシチジル酸ナトリウム塩等を出発原料とすることもできる。

【0024】

本発明に係る二本鎖短鎖化ポリヌクレオチドは、上記のようにして得られた低リン酸転位の短鎖化ポリヌクレオチドの中、二本鎖を形成しうる 2 つの短鎖化ポ

リヌクレオチドを、適当な溶液（例、0.15M NaCl含有10mMトリスー塩酸緩衝液（pH7））中で混合することにより得ることができ、また常法に従ってアニーリングすることにより得ることができる。アニーリングの方法としては、例えば、二本鎖を形成しうる2つの短鎖化ポリヌクレオチドを含む溶液を70～80℃まで昇温し、徐冷する方法を挙げることができる。

【0025】

上記のようにして得られた低リン酸転位の短鎖化ポリヌクレオチド又は二本鎖短鎖化ポリヌクレオチドは、凍結乾燥処理することができ、そうすることにより長期保存可能な凍結乾燥品を調製することができる。凍結乾燥処理は常法により行うことができる。例えば、上記条件にて得られた短鎖化ポリヌクレオチド溶液をろ過滅菌後、ろ液を乾熱滅菌処理した金属バットに注ぎ、-40～-20℃の棚温度で予備凍結を1～4時間程度行い、一次乾燥後、棚温度15～30℃減圧下で二次乾燥（10～50時間程度）して凍結乾燥品を得ることができる。かかる凍結乾燥品は、一般には任意の適当な溶液（注射用水、注射用蒸留水、生理食塩水、マルトース溶液、グルコース溶液等）の添加により再溶解し使用することができる。

【0026】

本発明に係る組成物、即ち、薬物を細胞内へ移入するのに有効な担体と、2'-5'リン酸ジエステル結合が全リン酸ジエステル結合の3%以下の短鎖化ポリヌクレオチドであって、二本鎖を形成しうる2つの短鎖化ポリヌクレオチド、又はその二本鎖を形成しうる2つの短鎖化ポリヌクレオチドから形成される二本鎖短鎖化ポリヌクレオチドとを必須構成成分として形成される複合体（以下「本複合体」という）を含有する組成物は、リボソームの一般的な製造方法と同様にして製造することができる。具体的には、薬物を細胞内へ移入するのに有効な担体、例えば、カチオニック・リボソーム又はその原料（例、2-0-(2-ジエチルアミノエチル)カルバモイル-1,3-0-ジオレオイルグリセロール等のグリセロール誘導体及びリン脂質）に、水（注射用水、注射用蒸留水、生理食塩水等）を加えこれらを攪拌混合し、この混合物を適当な分散機、例えば、ホモミキサー、ホモジナイザー、超音波分散機、超音波ホモジナイザー、高圧乳化分散機、マイクロフルイタイザー（商品名）、ナノマイザー（商品名）、De Bee 2000（商品名）、アル

ティマイザー（商品名）、マントン-ガウリン型高圧ホモジナイザーを用いて分散処理し、この脂質分散液に本発明に係る短鎖化ポリヌクレオチド又は二本鎖短鎖化ポリヌクレオチドを加え、再度適当な分散液で分散処理して本複合体を得た後、ろ過滅菌等の滅菌処理を行うことにより注射剤としての本発明組成物を製造することができる。その他の任意の添加剤は、製造時の適当な工程において添加することができる。また、薬物を細胞内へ移入するのに有効な担体、例えば、カチオニック・リポソーム又はその原料（例、2-0-(2- ジエチルアミノエチル)カルバモイル-1,3-0- ジオレオイルグリセロール等のグリセロール誘導体及びリン脂質）、及び本発明に係る短鎖化ポリヌクレオチド又は二本鎖短鎖化ポリヌクレオチドを予め混合し、この混合物に水を加えて、同時に分散処理して本複合体を含有する本発明組成物を製造することもできる。また、上記各製法において、適当な粗分散工程を経て製造することもできる。

【0027】

得られた本発明組成物は、凍結乾燥処理することができる。凍結乾燥処理することにより長期保存可能な本発明組成物の凍結乾燥製剤を調製することができる。凍結乾燥処理は、常法により行うことができる。例えば、上記分散処理後、ろ過滅菌処理して得られた本発明組成物を、所定量をバイアル瓶に分注する。約-40~-20℃の条件で予備凍結を約2~3時間程度行い、約0~10℃で減圧下に一時乾燥を行い、次いで、約15~25℃で減圧下に二次乾燥して凍結乾燥する。そして、一般的にはバイアル内部を窒素ガス等の不活性ガスで置換し、打栓して本発明組成物の凍結乾燥製剤を得ることができる。

【0028】

本発明組成物の凍結乾燥製剤は、一般には任意の適当な溶液の添加によって再溶解し使用することができる。このような再溶解液としては、注射用水、注射用蒸留水、生理食塩水、マルトース溶液、グルコース溶液、その他一般的な輸液等をあげることができる。

【0029】

本発明組成物、及びその凍結乾燥製剤は、薬剤として用いることができる。薬剤としての本発明組成物、及びその凍結乾燥製剤は、ポリヌクレオチドが有する

薬理作用を発揮することができる。従って、当該薬剤の具体例としては、例えば、インターフェロン誘導化剤、免疫賦活剤、細胞内ヌクレアーゼ活性化剤、癌治療剤もしくは予防剤、又は肝炎治療剤もしくは予防剤を挙げることができる。

【0030】

【実施例】

本発明を実施例及び試験例を挙げて更に詳しく説明する。本発明はこれらの実施例及び試験例によって何ら限定されるものではない。

参考例 1

イノシン-5'-二リン酸三ナトリウム塩 8 g 及び塩化マグネシウム 1 g に、0.1 M グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液 500 mL を加え、攪拌溶解した。6 N 水酸化ナトリウムを加え pH 9.3 に調整した後、38℃ で 1 時間静置した。更にポリヌクレオチドホスホリラーゼ溶液 1 mL を添加し、38℃ で 18 時間反応せしめた。かかる反応液に 0.2 M エチレンジアミン四酢酸 25 mL を加えて反応を停止せしめ、飽和食塩水 10 mL 及び無水エタノール 500 mL を加えてポリイノシン酸 (1973 b) を沈殿させた。

【0031】

参考例 2

シチジン-5'-二リン酸三ナトリウム塩 10 g 及び塩化マンガン 3 g に、0.2 M 炭酸水素ナトリウム-水酸化ナトリウム緩衝液約 1 L を加え、攪拌溶解した。6 N 水酸化ナトリウムを加え pH 9.8 に調整した後、36℃ で約 1 時間静置した。更に精製したポリヌクレオチドホスホリラーゼ溶液 2 mL を添加し、36℃ で 24 時間反応せしめた。0.2 M エチレンジアミン四酢酸 50 mL を加えて反応を停止せしめた。かかる反応液に飽和食塩水 20 mL 及び無水エタノール 1 L を加えポリシチジル酸 (3300 b) を沈殿させた。

【0032】

実施例 1

参考例 1 で得たポリイノシン酸を遠心分離し、その沈殿物を注射用水 500 mL に再溶解して透析処理した。透析内液を活性炭処理し、ろ過操作により活性炭を除去した後、ろ液に 6 N 水酸化ナトリウムを加え pH 8.5 に調整し、70℃ で 8 時間、

加熱加水分解し当該ポリイノシン酸を短鎖化した。かかる短鎖化ポリヌクレオチド溶液を活性炭処理し、ろ過操作により活性炭を除去した後、透析処理を行った。透析内液をろ過滅菌後、ろ液を常法により凍結乾燥処理し、リン酸転位の少ない本発明に係る短鎖化ポリヌクレオチド（ポリイノシン酸のナトリウム塩）の凍結乾燥品 1.9 g を得た（リン酸転位率 0.2%、平均鎖長 360 b）。

【 0 0 3 3 】

実施例 2

参考例 2 で得たポリシチジル酸を遠心分離し、その沈殿物を注射用水 500 mL に再溶解して透析処理した。透析内液を活性炭処理し、ろ過操作により活性炭を除去した後、ろ液に 6 N 水酸化ナトリウムを加え pH 9.0 に調整し、80℃ で 4 時間、加熱加水分解し当該ポリシチジル酸を短鎖化した。かかる短鎖化ポリヌクレオチド溶液を活性炭処理し、ろ過操作により活性炭を除去した後、透析処理を行った。透析内液をろ過滅菌後、ろ液を常法により凍結乾燥処理し、リン酸転位の少ない本発明に係る短鎖化ポリヌクレオチド（ポリシチジル酸のナトリウム塩）の凍結乾燥品 2.7 g を得た（リン酸転位率 0.1%、平均鎖長 318 b）。

【 0 0 3 4 】

実施例 3

ポリアデニル酸ナトリウム塩 ($S^0_{20,w}$ (沈降定数) : 7.2 、生化学工業 (株) 製) 1 g に、0.1 M トリスー塩酸緩衝液 (pH 8.0) 200 mL を加えて攪拌溶解した。試験例 5 記載の方法により平均鎖長をモニターしながら、60℃ で 48 時間、加熱加水分解することにより当該ポリアデニル酸を短鎖化した。かかる短鎖化ポリヌクレオチド溶液を透析処理した後、透析内液を常法により凍結乾燥処理し、リン酸転位の少ない本発明に係る短鎖化ポリヌクレオチド（ポリアデニル酸のナトリウム塩）の凍結乾燥品 0.3 g を得た（リン酸転位率 1.9%、平均鎖長 154 b）。

【 0 0 3 5 】

実施例 4

ポリウリジル酸ナトリウム塩 ($S^0_{20,w}$ (沈降定数) : 6.5 、生化学工業 (株) 製) 1 g に、0.2 M グリシンー水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 9.0) 200 mL を加えて攪拌溶解した。試験例 5 記載の方法により平均鎖長をモニターしながら、60℃

で25時間、加熱加水分解することにより当該ポリウリジル酸を短鎖化した。かかる短鎖化ポリヌクレオチド溶液を透析処理した後、透析内液を常法により凍結乾燥処理し、リン酸転位の少ない本発明に係る短鎖化ポリヌクレオチド（ポリウリジル酸のナトリウム塩）の凍結乾燥品 0.2 g を得た（リン酸転位率 1.2%、平均鎖長 108 b）。

【0036】

実施例 5

ポリイノシン酸ナトリウム塩 ($S^0_{20,w}$ (沈降定数) : 8.8、ヤマサ醤油 (株) 製) 250 mg に、50mL 0.1M トリスー塩酸緩衝液 (pH 8.0) を加えて攪拌溶解した。かかる溶液を 50 ~ 120℃ の適当な短鎖化温度で加熱し、試験例 5 記載の方法により平均鎖長をモニターしながら、任意の鎖長のポリイノシン酸をサンプリングした。その結果を表 1 に示す。得られたサンプル溶液はそれぞれ透析後、常法により凍結乾燥処理し各凍結乾燥品を得た。

【0037】

【表 1】

短鎖化温度	短鎖化時間	平均鎖長	リン酸転位率
50℃	50時間	1419 b	0.1 %
60℃	27時間	982 b	0.1 %
70℃	12時間	524 b	0.4 %
80℃	8時間	118 b	1.2 %
90℃	3時間	84 b	1.8 %
120℃	1時間	32 b	6.8 %

【0038】

実施例 6

ポリシチジル酸ナトリウム塩 ($S^0_{20,w}$ (沈降定数) : 8.6、ヤマサ醤油 (株) 製) 250 mg に、50mL 0.1M トリスー塩酸緩衝液 (pH 9.0) を加えて攪拌溶解した。かかる溶液を 55 ~ 120℃ の適当な短鎖化温度で加熱し、試験例 5 記載の方法により平均鎖長をモニターしながら、任意の鎖長のポリシチジル酸をサンプリング

した。その結果を表2に示す。得られたサンプル溶液はそれぞれ透析後、常法により凍結乾燥処理し各凍結乾燥品を得た。

【0039】

【表2】

短鎖化温度	短鎖化時間	平均鎖長	リン酸転位率
55℃	52時間	1923 b	0.1 %
65℃	48時間	907 b	0.1 %
75℃	23時間	489 b	0.3 %
80℃	12時間	139 b	0.8 %
90℃	8時間	76 b	1.2 %
120℃	1.5 時間	27 b	4.2 %

【0040】

上記実施例5及び6の結果から明らかなように、市販のポリイノシン酸ナトリウム塩及びポリシチジル酸ナトリウム塩を短鎖化する場合、短鎖化温度が55℃以下では加水分解の反応が十分に得られなかった。そのため、短鎖化時間約50時間後でも1 kbを越えるような平均鎖長を示した。一方、短鎖化温度を120℃としたサンプル及び短鎖化温度を90℃に設定したサンプルでは、加水分解速度が大きすぎるため、短鎖化を制御することは困難であった。特に短鎖化温度が120℃の場合では、短鎖化1～1.5時間でオリゴヌクレオチドに近い領域にまで短鎖化された。また、このサンプルではリン酸転位率も高く、塩基部分の分解も確認された。

【0041】

実施例7

2-0-(2- ジエチルアミノエチル)カルバモイル-1,3-0- ジオレオイルグリセロール1 gと精製卵黄レシチン2 gに、100 mLの注射用水に溶解したマルトース40 gを加え攪拌混合し、ホモジナイザーを用いて5分間分散処理してカチオニック・リポソーム（担体）の粗分散液を得た。かかる粗分散液を更に実験室用小型乳化分散機を用いて1時間分散処理し、カチオニック・リポソーム溶液を得た。こ

のカチオニック・リポソーム溶液に実施例 1 及び 2 で得られた低リン酸転位の短鎖化ポリイノシン酸及びポリシチジル酸のそれぞれ 200 mg を含む約 50 mL の水溶液を攪拌しながらゆっくりと添加し、更に 2 時間実験室用小型乳化分散機を用いて分散処理し、最後に注射用水で 400 mL に定容し、本複合体を含有する組成物を得た。更にこの本複合体を含有する組成物をろ過滅菌後、1 mL ずつバイアルに分注し常法に従って凍結乾燥製剤とした。この凍結乾燥製剤を 1 mL となるように注射用水で復水したときの本複合体の平均粒子径は 133 nm (光子相関法による) であった。

【0042】

実施例 8

2-0-(2- ジエチルアミノエチル)カルバモイル-1,3-0- ジオレオイルグリセロール 50 g と大豆レシチン 25 g に、3 L の注射用水に溶解したスクロース 1 kg を加え攪拌混合し、マントン-ガウリン型高圧ホモジナイザーを用いて 30 分間分散処理し、注射用水で 5 L に定容してカチオニック・リポソーム (担体) の分散液を得た。かかる担体分散液に実施例 1 及び 2 で得られた低リン酸転位の短鎖化ポリイノシン酸及びポリシチジル酸のそれぞれ 1 g を含む約 2 L の水溶液を攪拌しながらゆっくりと添加し、1 N 塩酸を用いて pH 5.5 に調整した後、さらに 1 時間、マントン-ガウリン型高圧ホモジナイザーを用いて分散処理し、最後に注射用水で 10 L に定容し、本複合体を含有する組成物を得た。更にこの本複合体を含有する組成物を 20 mL ずつバイアルに分注した後、常法に従って凍結乾燥製剤とした。この凍結乾燥製剤を 20 mL となるように注射用水で復水したときの本複合体の平均粒子径は 158 nm (光子相関法による) であった。

【0043】

実施例 9

2-0-(2- ジエチルアミノエチル)カルバモイル-1,3-0- ジオレオイルグリセロール 1 g と卵黄ホスファチド 2 g に、100 mL の注射用水に溶解したブドウ糖 40 g を加え攪拌混合し、ホモジナイザーを用いて 5 分間分散処理した後、500 mL に定容しカチオニック・リポソーム (担体) の粗分散液を得た。かかる粗分散液を更に実験室用小型乳化分散機を用いて 1 時間分散処理し、カチオニック・リポソ-

ム溶液を得た。かかる溶液を10mLづつバイアルに分注し常法に従って凍結乾燥した。かかる凍結乾燥品に、実施例1、2若しくは5、6で得られたリン酸転位の少ない短鎖化ポリイノシン酸及びポリシチジル酸、及び市販のポリイノシン酸ナトリウム塩 ($S_{20,w}^0$ (沈降定数): 8.8、ヤマサ醤油(株)製) 及びポリシチジル酸ナトリウム塩 ($S_{20,w}^0$ (沈降定数): 8.6、ヤマサ醤油(株)製) のそれぞれ5mgを含む10mLの水溶液を加え、プローブ型超音波分散機で10分間分散処理し、本複合体を含有する組成物を得た。

【0044】

実施例10

実施例3及び4で得られた高純度の短鎖化ポリアデニル酸及びポリウリジル酸のそれぞれ100 μ gを含む1mLの水溶液と、市販のリポフェクチン(商品名) 2mgを含む水溶液2mLを攪拌しながら混合し、プローブ型超音波分散機を用いて15分間分散処理し、本複合体を含有する組成物を得た。

【0045】

実施例11

ポリイノシン酸ナトリウム塩 ($S_{20,w}^0$ (沈降定数): 8.8、ヤマサ醤油(株)製) 約200mgに、0.2M酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.2)を加え、攪拌溶解した後、80℃に加熱し、試験例6記載の方法にてリン酸転位率をモニターしながら、任意のリン酸転位率のポリイノシン酸をサンプリングし、次いで各リン酸転位率のポリイノシン酸をホウ酸緩衝液(pH 8.5)中にて60℃に加熱し、試験例5記載の方法で鎖長をモニターしながら平均鎖長が 200 ± 50 bとなるよう短鎖化した。その結果を表3に示す。得られた短鎖化ポリイノシン酸溶液は、それぞれ透析処理した後、常法にて凍結乾燥処理し凍結乾燥品を得た。

【0046】

【表 3】

転移反応 温度	転移反応 時間	短鎖化 温度	短鎖化 時間	平均鎖長	リン酸転位率
80 °C	2.5時間	60 °C	3 時間	227 b	0.7 %
	6.5時間		1.5時間	230 b	2.0 %
	9 時間		4 時間	191 b	2.8 %
	16.5時間		2 時間	228 b	4.2 %

【0047】

実施例 12

ポリシチジル酸ナトリウム塩 ($S^0_{20,w}$ (沈降定数) : 8.6、ヤマサ醤油 (株) 製) 約 200 mg に、0.2 M 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.2) を加え、攪拌溶解した後、80°C に加熱し、試験例 6 記載の方法にてリン酸転位率をモニターしながら、任意のリン酸転位率のポリシチジル酸をサンプリングし、次いで各リン酸転位率のポリシチジル酸をホウ酸緩衝液 (pH 8.5) 中にて 70°C に加熱し、試験例 5 記載の方法にて鎖長をモニターしながら平均鎖長が 200 ± 50 b となるように短鎖化した。その結果を表 4 に示す。得られた短鎖化ポリシチジル酸溶液は、それぞれ透析処理した後、常法にて凍結乾燥処理し凍結乾燥品を得た。

【0048】

【表 4】

転移反応 温度	転移反応 時間	短鎖化 温度	短鎖化 時間	平均鎖長	リン酸転位率
80 °C	3 時間	70 °C	3 時間	157 b	1.2%
	4.5 時間		1 時間	218 b	1.9%
	6 時間		1 時間	236 b	2.7%
	10時間	未調整		170 b	3.8%

【0049】

実施例 13 二本鎖短鎖化ポリヌクレオチド

実施例 1、2、11 及び 12 で得たリン酸転位率が 0.7% のポリイノシン酸とリン酸転位率が 1.2 % のポリシチジル酸とを組み合わせた二本鎖短鎖化ポリヌクレオチド（二本鎖 RNA）、リン酸転位率が 2.0 % のポリイノシン酸 とリン酸転位率が 1.9% のポリシチジル酸とを組み合わせた二本鎖短鎖化ポリヌクレオチド（二本鎖 RNA）、リン酸転位率が 2.8 % のポリイノシン酸 とリン酸転位率が 2.7% のポリシチジル酸とを組み合わせた二本鎖短鎖化ポリヌクレオチド（二本鎖 RNA）を各々調製した。各二本鎖短鎖化ポリヌクレオチドは、各ポリイノシン酸 とポリシチジル酸とをトリスー塩酸緩衝液（pH 7、0.15N 水酸化ナトリウム含有）に溶解し、80℃ で 5 分間加熱した後、徐冷することにより得た。

【0050】

比較例 1 （実施例 1 に対応する従来法による製造－1）

ポリイノシン酸ナトリウム塩 ($S_{20,w}^0$ (沈降定数) : 8.8、ヤマサ醤油 (株) 製) 5 mg に注射用水 10 mL を加え攪拌溶解した。かかる溶液にホルムアミドを 10 mL 加え、80℃ で 5 時間加熱した（リン酸転位率 8.9%、平均鎖長 628 b）。

【0051】

比較例 2 （実施例 2 に対応する従来法による製造－1）

ポリシチジル酸ナトリウム塩 ($S_{20,w}^0$ (沈降定数) : 8.6、ヤマサ醤油 (株) 製) 5 mg に注射用水 10 mL を加え攪拌溶解した。かかる溶液にホルムアミドを 10 mL 加え、80℃ で 5 時間加熱した（リン酸転位率 4.2%、平均鎖長 751 b）。

【0052】

比較例 3 （実施例 1 に対応する従来法による製造－2）

ポリイノシン酸ナトリウム塩 ($S_{20,w}^0$ (沈降定数) : 8.8、ヤマサ醤油 (株) 製) 5 mg に注射用水 10 mL を加え攪拌溶解した。かかる溶液を 90℃ で 8 時間加熱した（リン酸転位率 7.1%、平均鎖長 213 b）。

【0053】

比較例 4 （実施例 2 に対応する従来法による製造－2）

ポリシチジル酸ナトリウム塩 ($S_{20,w}^0$ (沈降定数) : 8.6、ヤマサ醤油 (株) 製) 5 mg に注射用水 10 mL を加え攪拌溶解した。かかる溶液を 90℃ で 12 時間加熱し

た（リン酸転位率 4.2%、平均鎖長 289 b）。

【0054】

比較例 5

実施例 11 及び 12 で得たリン酸転位率が 4.2% のポリイノシン酸とリン酸転位率が 3.8 % のポリシチジル酸とを組み合わせた二本鎖短鎖化ポリヌクレオチド（二本鎖 RNA）を調製した。当該二本鎖短鎖化ポリヌクレオチドは、ポリイノシン酸 とポリシチジル酸とをポリヌクレオチドをトリスー塩酸緩衝液（pH 7、0.15N 水酸化ナトリウム含有）に溶解し、80℃ で 5 分間加熱した後、徐冷することにより得た。

【0055】

試験例 1 薬理活性に対する平均鎖長の及ぼす影響

実施例 9 に係る組成物の薬理活性は HeLa S3 癌細胞に対する細胞増殖抑制作用（in vitro）により評価した。実験は、HeLa S3 癌細胞を 96 穴のプレートに 10^4 細胞 / 穴の密度でまき、24 時間以上培養して細胞が十分にプレートに接着したことを確認後、当該組成物を添加し培養を続けた。3 日間 CO_2 インキュベーター内で培養した後、生細胞数を MTT 法で測定した。細胞増殖阻害率を次式より算出した。その結果を表 5 に示す。

【0056】

【数 2】

$$\text{細胞増殖阻害率 (\%)} = \frac{\text{複合体処理群の吸光度値}}{\text{コントロールの吸光度値}} \times 100 \quad \text{〔式 1〕}$$

【0057】

【表 5】

		HeLa S3 細胞の細胞増殖に対する 阻害率 (%)				
平均鎖長 (リン酸転移率)		ポリノシン酸 + ポリシチジル酸濃度 (ng / mL)				
ポリノシン酸	ポリシチジル酸	0.1	1	10	100	1000
>>1000 b ^(a)	>>1000 b ^(b)	86	100	100	100	100
1419 b(0.1%)	1923 b(0.1%)	79	98	100	100	100
982 b(0.1%)	907 b(0.2%)	65	96	100	100	100
524 b(0.4%)	489 b(0.3%)	23	85	98	100	100
360 b(0.2%)	318 b(0.1%)	17	70	97	100	100
118 b(1.2%)	139 b(0.8%)	9	45	89	98	100
84 b(1.8%)	76 b(1.2%)	0	0	6	72	92
32 b(6.8%)	27 b(4.2%)	0	0	0	18	48

(a) ポリイノシン酸のナトリウム塩 (ヤマサ醤油 (株) 製)

(b) ポリシチジル酸のナトリウム塩 (ヤマサ醤油 (株) 製)

【0058】

表 5 から明らかなように、癌細胞株である HeLa S3 に対する各組成物の細胞増殖抑制作用は、平均鎖長との間に強い相関があった。表 5 では、一般的にインターフェロン誘導剤として用いられる 1000 b 以上の長鎖長ポリイノシン酸・ポリシチジル酸で最も強い増殖抑制作用を示すが、本発明による平均鎖長の範囲が 100 b ~ 1000 b のリン酸転位の少ない短鎖化ポリイノシン酸・ポリシチジル酸でも、やや劣るもののなお十分に強い増殖抑制作用を保持していた。また、かかる増殖抑制作用は 100 b 未満のものでは急激に低下し、オリゴヌクレオチド領域に近いものではほとんど活性を示さなかった。

【0059】

試験例 2 骨髄細胞に対する影響

毒性評価として、骨髄毒性を検討した。ddY マウス (雄、8 週令) に、市販のポリイノシン酸ナトリウム塩 ($S_{20,w}^0$ (沈降定数) : 8.8、ヤマサ醤油 (株) 製

）及びポリシチジル酸ナトリウム塩 ($S_{20}^{0,w}$ (沈降定数。: 8.6、ヤマサ醤油 (株) 製) と実施例 5 及び 6 に係る、リン酸転位の少ないポリイノシン酸、ポリシチジル酸のうち平均鎖長がそれぞれ 982 b 及び 907 b のものを静脈内投与し、翌日大腿骨より骨髓細胞を得た。細胞をニューメチレンブルー及びギムザ染色し、網状赤血球と成熟赤血球の数を測定した。その結果を表 6 に示す。表 6 の骨髓毒性は全赤血球数に対する網状赤血球数の比であり、次式により定義される。また、* 印は有意水準 $p < 0.01$ でコントロール群と有意差 (ダネットの多重比較法による) があることを意味している。

【0060】

【数 3】

$$\text{骨髓毒性} = \frac{\text{網状赤血球数}}{\text{網状赤血球数} + \text{成熟赤血球数}}$$

【0061】

【表 6】

平均鎖長		投与量	骨髓毒性	コントロールに対する変化率
ポリイノシン酸	ポリシチジル酸			
>>1000 b ^(a)	>>1000 b ^(b)	1mg/kg	0.23 *	39 %
		5mg/kg	0.15 *	61 %
982 b	907 b	5mg/kg	0.31	17 %
		25mg/kg	0.29	24 %

^(a) ポリイノシン酸のナトリウム塩 (ヤマサ醤油 (株) 製)

^(b) ポリシチジル酸のナトリウム塩 (ヤマサ醤油 (株) 製)

【0062】

表 6 から明らかなように、一般的にインターフェロン誘導剤として用いられる 1000 b を超える長鎖長のポリイノシン酸・ポリシチジル酸では、1 mg/kg の投与量でもコントロールに対する変化が 39% に達したにもかかわらず、本発明に係る

、平均鎖長の範囲が 100 b~1000 bの低リン酸転位の短鎖化ポリイノシン酸・ポリシチジル酸では、その25倍の投与量でもコントロールに対して有意な差がなかった。この結果からポリイノシン酸・ポリシチジル酸の毒性は薬理活性と同様、平均鎖長と極めて相関が強いことがわかった。かかる毒性が、本発明に係る短鎖化ポリヌクレオチドによって飛躍的に改善されたことは全く意外であった。

【0063】

試験例3 A431癌細胞に対する細胞増殖抑制作用 (in vitro) (平均鎖長 200±50b)

実施例11及び12に係るリン酸転位率が0.7~4.2%のポリイノシン酸とリン酸転位率が1.2~3.8%のポリシチジル酸、実施例1及び2に係る短鎖化ポリイノシン酸及びポリシチジル酸を用い、実施例9と同様に操作して組成物を調製した。A431癌細胞を96穴のプレートに 10^4 細胞/穴の密度でまき、5時間以上培養して細胞が十分にプレートに接着したことを確認後、当該組成物を添加し培養を続けた。各組成物添加後、3日間CO₂インキュベーター内で培養した後、生細胞数をMTT法で測定した。細胞増殖阻害率を式1から求め、かかる細胞増殖阻害率から50%細胞増殖阻害率に相当するポリイノシン酸とポリシチジル酸の合計濃度(IC₅₀値)を算出した。その結果を表7に示す。

【0064】

【表 7】

		ポリノシン酸のリン酸転移率				
		0.2%	0.7%	2.0%	2.8%	4.2%
ポリチジル酸の リン酸 転移率	0.1 %	1.2	1.2	1.3	3.5	6.5
	1.2 %	1.1	1.2	1.4	5.6	10
	1.9 %	1.2	1.3	1.4	8.2	17
	2.7 %	4.2	6.2	10	17	36
	3.8 %	7.8	11	23	41	66
		A431癌細胞に対する 50%増殖抑制濃度 (ng/ml)				

【0065】

表 7 から明らかなように、癌細胞である A431 に対する当該組成物の細胞増殖抑制作用は、リン酸転位率との間に強い相関があった。即ち、ポリイノシン酸、ポリシチジル酸に拘らずリン酸基の 3' 位から 2' 位への転位が多いものほど、増殖抑制阻害作用が弱くなる傾向を示した。注目される点は、本発明に係るリン酸転位の少ない短鎖化ポリイノシン酸、短鎖化ポリシチジル酸（リン酸転位率 3 % 以下、特に 2 % 以下）の組み合わせでは、増殖抑制作用が飛躍的に強かった。また、リン酸転位率が 3 %、特に 2 % を超えるポリイノシン酸、ポリシチジル酸の組み合わせでは相乗的に作用が弱くなる傾向があった。例えば表 7 で、リン酸基の転位率が 2.0% 及び 1.9% のポリイノシン酸、ポリシチジル酸の組み合わせは、同じく 2.8% 及び 2.7% 若しくは 4.2% 及び 3.8% のポリイノシン酸、ポリシチジル酸の組み合わせに比べ IC_{50} の比が 12 倍若しくは 47 倍も向上した。リン酸基の 3' 位から 2' 位への転位率が 3 %、特に 2 % を境界として、薬理活性がこのように急激に向上することは、極めて意外であった。

【0066】

試験例 4 リン酸転位による融解温度 (T_m) 及び薬理活性の変化

二本鎖 RNA は再び温度を上げていくと特定の温度のところで、再び一本鎖 R

NAに解離する。この温度はRNAの種類により特定の値を示すことから、この温度を二本鎖RNAの融解温度とし、一般には T_m 値と呼んでいる。このような T_m 値の測定には様々な方法があるが、本試験例では最も一般的な吸光光度法を用い、実施例13及び比較例5に係る二本鎖RNAの融解温度を測定した。その結果を表8に示す。表8に併記した IC_{50} 値は、試験例3による結果である。

【0067】

【表8】

ポリノシン酸 リン酸転移率	ポリシチジル酸 リン酸転移率	融解温度 T_m 値	IC_{50}
0.2 %	0.1 %	61℃	1.2 ng / mL
0.7 %	1.2 %	62℃	1.2 ng / mL
2.0 %	1.9 %	59℃	1.4 ng / mL
2.8 %	2.7 %	59℃	17 ng / mL
4.2 %	3.8 %	58℃	66 ng / mL

【0068】

リン酸転位率がおおよそ0～4%のポリノシン酸・ポリシチジル酸で T_m 値を測定した結果、各組み合わせにおいて顕著な差は見られなかった（一般にインターフェロン誘導剤として用いられるような長鎖長のポリノシン酸・ポリシチジル酸の T_m 値は61℃である）。即ち、リン酸転位率がおおよそ0～4%のポリノシン酸・ポリシチジル酸は、二本鎖RNAの特徴である二重らせん構造をとり得ることが明らかとなった。しかしながら、試験例3から、リン酸転位率が2%ないしは3%を境として薬理活性が4倍～50倍以上も異なることから、ポリノシン酸・ポリシチジル酸の主薬効である免疫賦活作用や抗癌作用は、二本鎖RNAの二重らせん構造のみに影響するのではなく、リン酸基の転位率も影響することがわかった。しかもその薬理活性は、リン酸基の3'位から2'位への転位が2%ないしは3%を境にして急激に向上することがわかり、全く意外なことであった。

【0069】

試験例 5 短鎖化ポリヌクレオチドの平均鎖長の測定 (GPC法)

1 mg/mL のポリヌクレオチド水溶液を用いて、下記のゲルろ過クロマトグラフィー (GPC) 操作条件で試験し、平均鎖長を求めた。

【0070】

【表 9】

GPC 操作条件

検出波長	: UV 260nm
カラム	: 東ソーTSKgel G5000PWXL 7.8mmφ×300mm
移動相	: 7M尿素を含む50mMトリス塩酸緩衝液 (pH7.5)
流速	: 0.5mL/min.
サイズマーカー	: RNA Ladder (1770 b, 1520 b, 1280 b, 780 b, 530 b, 400 b, 280 b, 155 b) (ギコ BRL 社製)

【0071】

試験例 6 リン酸転位率の測定

1 mg/mL のポリヌクレオチド水溶液 1 mLに、500U/mL のヌクレアーゼP1 (青カビ由来、生化学工業社製) 水溶液3.2mL を加え、さらに水を加えて 5 mLに希釈した。かかる水溶液を37℃の湯浴上で 1 時間反応させた後、水を加えて10mLとした。かかる反応液から3.2mL をとり、0.1U/mL アルカリホスファターゼ (仔牛小腸由来、生化学工業社製) 水溶液0.8mL を加えた後、37℃の湯浴上で30分間反応させた。この溶液を適当に希釈し、下記の液体クロマトグラフィー操作条件により試験を行い、2'-5' リン酸ジエステル結合を有する二量体を定量し、リン酸転移率を測定した。

【0072】

【表 10】

液体クロマトグラフィー操作条件

検出波長	: UV 260nm
カラム	: 資生堂カゲルパック C ₁₈ UG120 5 μm 4.6mmφ×250mm
移動相	: 5 mM硫酸水素テトラギンモニウムを含む50mMリン酸緩衝液 (pH8) とメタノールの混液 (95:5)
流速	: 1 mL/min.

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 医薬として特に有用な短鎖化ポリヌクレオチドやそれを含有する医薬組成物を提供することにある。

【解決手段】 短鎖化されたポリヌクレオチド又はその塩において、2'-5' リン酸ジエステル結合が全リン酸ジエステル結合の3%以下であることを特徴とする短鎖化ポリヌクレオチド又はその塩、及びそれらいずれかを含有する医薬組成物である。

【選択図】 なし

特平 11-035963

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000004156]

1. 変更年月日	1990年 8月13日
[変更理由]	新規登録
住 所	京都府京都市南区吉祥院西ノ庄門口町14番地
氏 名	日本新薬株式会社